

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b>  <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/18956</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 6. April 2000 (06.04.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/07209 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 29. September 1999 (29.09.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 44 931.3      30. September 1998 (30.09.98)    DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> SEEGER, Stefan [DE/DE]; Johann-Wolfgang-von-Goethe-Strasse 2, D-93077 Bad Abbach a.d. Donau (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> KINDLER, Matthias usw.; Hoffmann . Eitle, Arabellastrasse 4, D-81925 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR DNA- OR RNA-SEQUENCING  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR DNS- ODER RNS-SEQUENZIERUNG  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to methods for the base sequencing of deoxyribonucleic acid or ribonucleic acid, comprising the following steps: (1) immobilising DNA or RNA single strands on a planar support; (2) focussing a laser beam on a single, immobilised single strand; (3) producing a DNA or RNA complementary strand of said immobilised, focussed single strand by adding a solution containing (i) at least one luminescence-tagged nucleotide of the bases adenine, cytosine, guanine and thymine for producing a DNA or RNA complementary strand or at least one luminescence-tagged nucleotide of the bases adenine, cytosine, guanine and uracil for producing an RNA complementary strand and (ii) a polymerase, each insertion of a luminescence-tagged nucleotide into the complementary strand being detected with a single-molecule detector and the luminescence signal of the previous luminescence-tagged nucleotide being deleted before the next luminescence-tagged nucleotide is inserted.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft Verfahren zur Basensequenzierung von Desoxyribonukleinsäure oder Ribonukleinsäure, welche die folgenden Schritte umfassen: (1) Immobilisieren von DNS- oder RNS-Einzelsträngen an einen planaren Träger; (2) Fokussieren eines Laserstrahles auf einen einzelnen, immobilisierten Einzelstrang; (3) Aufbau eines DNS- oder RNS-Komplementärstranges des immobilisierten, fokussierten Einzelstranges durch Zugabe einer Lösung, enthaltend (i) mindestens ein lumineszenzmarkiertes Nukleotid der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zum Aufbau eines DNS-Komplementärstranges oder mindestens ein lumineszenzmarkiertes Nukleotid der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracyl zum Aufbau eines RNS-Komplementärstranges und (ii) eine Polymerase, wobei jeder Einbau eines lumineszenzmarkierten Nukleotides in den Komplementärstrang mit einem Einzelmoleküldetektor detektiert wird, und vor dem Einbau des jeweils nächsten lumineszenzmarkierten Nukleotides das Lumineszenzsignal des vorhergehenden lumineszenzmarkierten Nukleotides gelöscht wird.		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TC	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

5

### Verfahren zur DNS- oder RNS-Sequenzierung

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Basensequenzierung von Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder Ribonukleinsäure (RNS).

15

Die Basensequenzierung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und der Ribonukleinsäure (RNS) gehören heute zu den wichtigsten Analysetechniken in der Biotechnologie, pharmazeutischen Industrie, Nahrungsmittelindustrie, medizinischen Diagnostik und anderen Anwendungsfeldern. Die Entschlüsselung der Genome der Organismen eröffnet die Möglichkeit zur Diagnose, Therapie und Prävention von Krankheiten wie auch zur gezielten Modifikation des Erbgutes zur Generierung von Organismen mit modifizierten Eigenschaften. Um dieses Potential jedoch nutzen zu können, sind ausreichend schnelle Sequenzierverfahren erforderlich.

25

Die klassischen Sequenzierverfahren nach Sanger et al (Proceedings of the National Academy of Science, USA, 74, 5463-7; 1977) wie auch nach Maxam und Gilbert (Proceedings of the National Academy of Science, USA, 74, 560-564; 1977), die noch heute Grundlage der Standardsequenzierverfahren sind, benötigen zur Sequenzierung von 200 Nukleotiden 1 bis 3 Tage. Dies erscheint beispielsweise für die Aufgabe, den Humangenom mit ungefähr  $3 \cdot 10^9$  Basenpaaren zu sequenzieren, als zu langsam.

35

Jüngere Ansätze zur Beschleunigung von Sequenzierverfahren konzentrieren sich auf Verfahren, bei denen einzelne Nukleotide fluoreszenzspektroskopisch detektiert werden. Das US-Patent 4 962 037 offenbart ein Sequenzierverfahren, wonach ein komplementärer Nukleinsäurestrang, bei dem an jeder Base ein für die Base charakteristisches Fluoreszenz-

40

- 5 farbstoffmolekül kovalent gebunden ist, an einem Einzelstrang synthetisiert wird. Dieses fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuremolekül wird an eine Partikeloberfläche gebunden, wobei das einzelne Partikel beispielsweise mit einer Mikroinjektionspipette in einem Flüssigkeitsstrom gehalten
- 10 wird. Durch Verwendung einer Exonuklease wird dann jede fluoreszenzmarkierte Base sukzessive von dem Nukleinsäurestrang abgespalten, und in dem Flüssigkeitsstrom in den Fokus eines Laserstrahls geleitet, wo nach der Anregung die für die Base spezifische Fluoreszenz nachgewiesen wird. Die
- 15 Geschwindigkeit dieses Sequenzierverfahrens ist theoretisch lediglich durch die Schneidegeschwindigkeit der Exonuklease begrenzt, so daß von einer Sequenziergeschwindigkeit von 100 bis 1000 Basen/Sekunde ausgegangen wird.
- 20 Voraussetzung für das Durchführen des in US 4 962 037 offenbarten Verfahrens ist, daß lediglich ein einzelnes Nukleinsäuremolekül an einem einzelnen Partikel festgehalten wird. Die Manipulation eines einzelnen Partikels mit einem einzelnen Nukleinsäuremolekül ist jedoch technisch sehr
- 25 aufwendig und hat sich als für praktische Anwendungen nicht geeignet erwiesen. Weiterhin ist die Verwendung einer Exonuklease notwendig, die Farbstoff-markierte Nukleotide abzuspalten vermag. Dies macht die Entwicklung dieser Verfahren komplizierter, und die Verwendung hierfür
- 30 modifizierter Exonukleasen führt zudem in der Regel zu einer höheren Ungenauigkeit bei der Basensequenzbestimmung.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Verfahren zur Basensequenzierung von DNS oder RNS bereitzustellen, bei

35 denen die Vorteile bezüglich der hohen Geschwindigkeit eines Sequenzierverfahrens mit Einzelmoleküldetektion, wie es in dem Stand der Technik beschrieben ist, genutzt werden, jedoch gleichzeitig die oben erwähnten Nachteile überwunden werden.

5 Zur Lösung dieser Aufgabe stellt die Erfindung ein erstes  
Verfahren zur Basensequenzierung von DNS oder RNS bereit,  
umfassend die Schritte:

- 10 (1) Immobilisieren von DNS- oder RNS-Einzelsträngen auf einer  
Oberfläche;  
(2) Fokussieren eines Laserstrahles auf einen einzelnen,  
immobilisierten Einzelstrang;  
(3) Aufbau eines DNS- oder RNS-Komplementärstranges des  
15 immobilisierten, fokussierten Einzelstranges durch Zugabe  
einer Lösung, enthaltend (i) ein Gemisch von Nukleotiden  
der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zum Aufbau  
eines DNS-Komplementärstranges oder ein Gemisch von  
Nukleotiden der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil  
zum Aufbau eines RNS- Komplementärstranges und (ii) eine  
20 Polymerase, wobei

- 3a) mindestens zwei der vier Nukleotide der Basen  
Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin oder mindestens  
25 zwei der vier Nukleotide der Basen Adenin, Cytosin,  
Guanin und Uracil ganz oder teilweise  
unterschiedlich lumineszenzmarkiert sind,  
3b) jeder Einbau eines lumineszenzmarkierten Nukleotides  
in den Komplementärstrang mit einem  
Einzelmoleküldetektor detektiert wird, und  
30 3c) vor dem Einbau des jeweils nächsten  
lumineszenzmarkierten Nukleotides das  
Lumineszenzsignal des vorhergehenden  
lumineszenzmarkierten Nukleotides gelöscht wird.

35 Weiterhin stellt die Erfindung ein zweites Verfahren zur  
Basensequenzierung von DNS oder RNS bereit, umfassend die  
Schritte:

- 40 (1) Immobilisieren von DNS- oder RNS-Einzelsträngen auf einer  
Oberfläche;

- 5 (2) Fokussieren eines Laserstrahles auf einen einzelnen,  
immobilisierten Einzelstrang;
- (3') Aufbau eines DNS- oder RNS-Komplementärstranges des  
immobilisierten, fokussierten Einzelstranges durch  
10 aufeinanderfolgende Zugabe von Lösungen, enthaltend  
jeweils (i) ein Nukleotid der Basen Adenin, Cytosin,  
Guanin und Thymin zum Aufbau eines DNS-  
Komplementärstranges oder ein Nukleotid der Basen Adenin,  
Cytosin, Guanin und Uracil zum Aufbau eines RNS-  
Komplementärstranges und (ii) eine Polymerase, wobei
- 15 3a') das in der Lösung enthaltende Nukleotid  
lumineszenzmarkiert ist,
- 3b) jeder Einbau eines lumineszenzmarkierten  
Nukleotides in den Komplementärstrang mit einem  
20 Einzelmoleküldetektor detektiert wird,
- 3c) nach Detektion eines Einbaus eines  
lumineszenzmarkierten Nukleotides in den  
Komplementärstrang das Lumineszenzsignal des  
eingebauten Nukleotides gelöscht wird, und
- 25 3d') vor der Zugabe der jeweils nächsten Lösung gespült  
wird.

Der Begriff DNS- oder RNS-Einzelstrang bezeichnet  
erfindungsgemäß ein nicht hybridisiertes DNS- bzw. RNS-  
30 Molekül. Ein solcher Einzelstrang kann durch direkte  
Isolierung aus einem Organismus einschließlich gentechnischer  
Verfahren wie auch durch die Behandlung solcher Moleküle mit  
Restriktionsenzymen erhalten werden. Oligonukleotide, PCR-  
Produkte und c-DNA zählen zu diesen Einzelsträngen. Die  
35 Herstellung der Einzelstränge aus den Doppelsträngen ist dem  
Fachmann bekannt, beispielsweise aus J.Sambrook et al.,  
Molecular Cloning, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory  
Press, 1989. Die Behandlung mit Restriktionsenzymen kann  
unmittelbar vor der Immobilisierung durchgeführt werden, was  
40 zu einer Immobilisierung von Molekülen mit unterschiedlichen  
Basensequenzen führt. Die Einzelstränge haben vorzugsweise 5

5 bis 2000 Basen, besonders bevorzugt 100 bis 1000 Basen. Es kommen jedoch prinzipiell auch Basenlängen von bis zu 100 Kilobasen in Betracht.

10 In Schritt (1) der erfindungsgemäßen Verfahren werden die DNS- oder RNS-Einzelstränge auf einer Oberfläche immobilisiert. Die Oberfläche ist vorzugsweise die Oberfläche eines planaren Trägers, der die für die unten beschriebene Einzelmoleküldetektion nötige optische Transparenz aufweist. Besonders bevorzugt ist ein Glasträger, insbesondere ein  
15 Quarzglasträger. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Oberfläche des Trägers, auf der die Einzelstränge immobilisiert werden, durch Aufbringen eines Langmuir-Blodgett-Films chemisch modifiziert. Besonders bevorzugt ist ein Langmuir-Blodgett-Film eines Cellulosederivates,  
20 insbesondere Trimethylsilylethercellulosecinnamcoat (TMSCC) und Aminoalkyltrimethylsilylethercellulose (ATMSC).

Die Einzelstränge können adsorptiv, über eine kovalente Bindung wie auch über Fangmoleküle auf der Oberfläche  
25 immobilisiert werden. Fangmoleküle sind insbesondere Nukleotid-Oligomere, die auf der Oberfläche immobilisiert sind und die Einzelstränge durch Hybridisierung binden können. Die Immobilisierung des Oligomers auf der Oberfläche kann durch kovalente Bindung an eine chemisch reaktive Gruppe  
30 an der Oberfläche oder durch Adsorption erfolgen. Bevorzugt ist insbesondere die Immobilisierung mit der (Strept-)Avidin-Biotin-Technik, wobei das Oligomer mit Biotin derivatisiert ist und an ein auf der Oberfläche immobilisiertes (Strept-)Avidin-Molekül bindet. Die Immobilisierung des  
35 (Strept-)Avidin-Moleküls ist nicht beschränkt. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die (Strept-)Avidin-Moleküle über einen Langmuir-Blodgett-Film eines Cellulosederivates auf der Oberfläche immobilisiert. Insbesondere bevorzugt ist es, die Oberfläche zunächst mit 1  
40 bis 8 Monolagen Aminoalkyltrimethylsilylethercellulose (ATMSC) und anschließend 1 bis 8 Monolagen Trimethylsilyl-

5 ethercellulosecinnaat (TMSCC) zu beschichten. Für die  
kovalente Ankopplung der (Strept-)Avidin-Moleküle werden dann  
die Cinnamoyl-Gruppen des TMSCC zu Aldehyd-Gruppen oxidiert.  
Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, als Fangmoleküle  
5'-Amino-modifizierte Oligonukleotide zu verwenden, die  
10 direkt an Aldehyd-Gruppen, beispielsweise Aldehyd-Gruppen,  
die an Langmuir-Blodgett-Filmen in der oben beschriebenen Art  
und Weise erhalten werden, binden.

Weiterhin ist es bevorzugt, die DNS- oder RNS-Einzelstränge  
15 in Schritt (1) auf der Oberfläche derart zu immobilisieren,  
daß die DNS- oder RNS-Einzelstränge in einer  
Oberflächendichte von  $\leq 1$  Molekül/ $\mu\text{m}^2$  vorliegen.

Diese Oberflächendichte wird vorzugsweise durch Regulierung  
20 der Oberflächendichte kovalenter Bindungspunkte auf der  
Oberfläche eingestellt. Eine Möglichkeit hierfür bieten  
photovernetzbare Langmuir-Blodgett-Filme, wie der oben  
aufgeführte TMSCC-Film, auf denen in Abhängigkeit von der  
Bestrahlungszeit mit UV-Licht reaktive Gruppen auf der  
25 Oberfläche entstehen. Diese reaktiven Gruppen stehen dann für  
eine kovalente Bindung von DNS- oder RNS-Einzelsträngen,  
Nukleotid-Oligomeren oder (Strept-)Avidin-Molekülen zur  
Verfügung. Alternativ läßt sich die Oberflächendichte der  
Einzelstränge durch die Konzentration der zu  
30 immobilisierenden Einzelstränge oder der zu immobilisierenden  
Oligomere in der Lösung einstellen. Die Konzentration hängt  
hierbei von der Oberfläche des Trägers wie auch von dem  
Volumen der Lösung der zu immobilisierenden Einzelstränge  
bzw. der zu immobilisierenden Oligomere ab.

35 In Schritt (2) der erfindungsgemäßen Verfahren wird ein  
Laserstrahl auf einen einzelnen, immobilisierten Einzelstrang  
fokussiert. Die Wahl des Laserstrahls hängt hierbei von der  
verwendeten Lumineszenzmarkierung der Nukleotidbasen ab, die  
40 weiter unten beschrieben wird. Zum Fokussieren des  
Laserstrahls auf den immobilisierten Einzelstrang in Schritt



- 5 (2) wird vorzugsweise so vorgegangen, daß (a) ein  
lumineszenzmarkiertes Nukleotid-Oligomer mit dem Einzelstrang  
hybridisiert wird, (b) die Position des hybridisierten  
Nukleotid-Oligomers durch Abscannen der Oberfläche, auf der  
der Einzelstrang immobilisiert ist, mit einem Laserstrahl  
10 bestimmt wird, und (c) das Lumineszenzsignal des  
hybridisierten Nukleotid-Oligomers anschließend gelöscht  
wird. Der Schritt (a) kann sowohl vor wie auch nach der  
Immobilisierung des Einzelstranges durchgeführt werden.  
Hierbei werden die Lumineszenzmarkierung des Nukleotid-  
15 Oligomers und der Laserstrahl so gewählt, daß in Schritt (b)  
die Lumineszenzmarkierung zur Lumineszenz angeregt wird. Das  
Abscannen der Oberfläche mit dem Laserstrahl in Schritt (b)  
kann mit herkömmlichen Raster- bzw. Scanvorrichtungen, wie  
sie beispielsweise in Laserscanningmikroskopen eingesetzt  
20 werden, durchgeführt werden. Das Löschen des  
Lumineszenzsignals in Schritt (c) kann entweder durch  
Abspalten der Lumineszenzmarkierung, insbesondere  
Photoabspaltung, oder durch Photobleaching erfolgen.
- 25 In Schritt (3) des ersten erfindungsgemäßen Verfahrens wird  
ein DNS- oder RNS-Komplementärstrang des immobilisierten,  
fokussierten Einzelstranges durch Zugabe einer Lösung,  
enthaltend (i) ein Gemisch von Nukleotiden der Basen Adenin,  
Cytosin, Guanin und Thymin zum Aufbau eines DNS-  
30 Komplementärstranges oder ein Gemisch von Nukleotiden der  
Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil zum Aufbau eines  
RNS- Komplementärstranges und (ii) eine Polymerase aufgebaut.  
Alternativ könnte auch der Aufbau eines Polymers der Basen  
Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin bzw. der Basen Adenin,  
35 Cytosin, Guanin und Uracil zu synthetischer Nukleinsäure,  
d.h. solchen Nukleinsäuren, die kein Phosphatrückgrat,  
sondern beispielsweise ein Peptidrückgrat aufweisen  
(Peptidnukleinsäuren), durchgeführt werden. Erfindungsgemäß  
sind mindestens zwei der vier Nukleotide der Basen Adenin,  
40 Cytosin, Guanin und Thymin oder mindestens zwei der vier  
Nukleotide der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil ganz

5 oder teilweise unterschiedlich lumineszenzmarkiert.  
Insbesondere bevorzugt ist es, daß alle vier Basen  
unterschiedliche Lumineszenzmarkierungen aufweisen. Dies  
erlaubt die Bestimmung einer Basensequenz bei lediglich  
einfachem Aufbau eines Komplementärstranges. Werden lediglich  
10 zwei der vier Basen unterschiedlich lumineszenzmarkiert, so  
muß der Aufbau fünfmal wiederholt werden, um eine komplette  
Sequenz zu erhalten, wobei bei jeder Wiederholung eine  
unterschiedliche Kombination von markierten Basen verwendet  
wird. Bei Verwendung von drei unterschiedlich markierten  
15 Basen muß der Aufbau des Komplementärstranges dreimal mit  
jeweils einer unterschiedlichen Kombination von markierten  
Basen wiederholt werden.

In Schritt (3') des zweiten erfindungsgemäßen Verfahrens wird  
20 ein DNS- oder RNS-Komplementärstrang des immobilisierten,  
fokussierten Einzelstranges durch aufeinanderfolgende Zugabe  
von Lösungen, enthaltend jeweils (i) ein Nukleotid der Basen  
Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zum Aufbau eines DNS-  
Komplementärstranges oder ein Nukleotid der Basen Adenin,  
25 Cytosin, Guanin und Uracil zum Aufbau eines RNS-  
Komplementärstranges und (ii) eine Polymerase aufgebaut,  
wobei das in der Lösung enthaltende Nukleotid  
lumineszenzmarkiert ist. Wiederum könnte alternativ auch der  
Aufbau eines Polymers der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und  
30 Thymin bzw. der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil zu  
synthetischer Nukleinsäure, d.h. solchen Nukleinsäuren, die  
kein Phosphatrückgrat, sondern beispielsweise ein  
Peptidrückgrat aufweisen (Peptidnukleinsäuren), durchgeführt  
werden. Gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt  
35 der Aufbau des Komplementärstranges durch aufeinanderfolgende  
Zugaben der jeweiligen Nukleotid-Lösung, wobei vor der Zugabe  
der jeweils nächsten Lösung gespült werden muß. Sollte nach  
Zugabe der Nukleotid-Lösung ein Signal eines Einbaus mit dem  
Einzelmoleküldetektor erfolgen, so kann somit das Signal  
40 einer bestimmten Base zugeordnet werden. Werden  
beispielsweise Lösungen, enthaltend eine Polymerase sowie

- 5 jeweils ein Nukleotid der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, zu dem immobilisierten Einzelstrang gegeben, und wird lediglich bei der Zugabe der zweiten Lösung, d.h. der Cytosin-Lösung, ein Signal detektiert, so ist die entsprechende Base des immobilisierten Einzelstranges Guanin.
- 10 Wird hingegen bei Zugabe sowohl der zweiten als auch der dritten Lösung ein Signal detektiert, so wird somit die Sequenzfolge Guanin-Cytosin auf dem immobilisierten Einzelstrang gefunden. Durch Wiederholung der Zugabe der entsprechenden Lösungen läßt sich so die Gesamtsequenz des
- 15 immobilisierten Einzelstranges bestimmen.

Die in der Lösung enthaltende Polymerase katalysiert den Aufbau des Komplementärstranges. Ihre Wahl ist nicht beschränkt, sofern sie den Aufbau des Komplementärstranges

20 mit den Farbstoff-markierten Nukleotiden ermöglicht. Beispiele für die erfindungsgemäß verwendbaren Polymerasen sind native T4-Polymerase, native T7-Polymerase, das Klenow-Fragment von E.coli pol I, Exo III, E.coli pol III Holoenzym, die Schlangenvenomphosphodiesterase und Taq-Polymerase.

- 25 Jeder durch die Polymerase katalysierte Einbau eines lumineszenzmarkierten Nukleotids in den Komplementärstrang wird erfindungsgemäß mit einem Einzelmoleküldetektor detektiert. Der erfindungsgemäß verwendbare Einzelmolekül-
- 30 detektor ist nicht beschränkt, sofern er bei gegebenem Detektionsvolumen, gegebener Wellenlänge und Leistung des Laserstrahles und gegebener Lumineszenzmarkierung des Nukleotides die Detektion eines einzelnen lumineszenzmarkierten Nukleotidmoleküls erlaubt. Die Anforderungen an
- 35 die Empfindlichkeit des Einzelmoleküldetektors steigen hierbei mit zunehmendem Detektionsvolumen und sinkender Leistung des Laserstrahles. Es ist daher insbesondere bevorzugt, das Detektionsvolumen zu minimieren, indem man den Laserstrahl beugungsbegrenzt fokussiert.

- 5 Zur Anregung der Lumineszenzmarkierung wird Laserlicht mit einer Wellenlänge von 600 nm und mehr bevorzugt, um das Auftreten von Streulicht zu minimieren. Insbesondere sind Halbleiterlaser in diesem Wellenlängenbereich aus Kostengründen für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt.
- 10 Erfolgt die Detektion über eine Fluoreszenzlebensdauer-Messung, so ist der erfindungsgemäß verwendete Laser moduliert, vorzugsweise gepulst.

- Die Lumineszenzmarkierung wird auf das verwendete Laserlicht wie auch den verwendeten Einzelmoleküldetektor abgestimmt.
- 15 Erfindungsgemäß werden bevorzugt Fluorophore als Lumineszenzmarkierung verwendet. Ein geeigneter Satz an Fluorophoren (d.h. ein Fluorophor pro markiertes Nukleotid) wird abhängig von der Art der Detektion gewählt. Zu unterscheiden ist
- 20 hierbei zwischen der Detektion der Farbe (d.h. der Wellenlänge der emittierten Photonen) und der Detektion der Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors. Beispiele für Farbstoffsätze zur Detektion der Fluoreszenzlebensdauer sind beschrieben in S. Seeger et al., Ber Bunsenges. Physikal.
- 25 Chem. 97, 1542-1548 (1993) sowie M. Sauer et al., J. Fluorescence 3, 131-139 (1993); Beispiele für Farbstoffsätze zur Detektion der Farbe sind beschrieben in L.M. Smith et al., Nature 312, 674-670 (1989) sowie J.M. Prober et al., Science 238, 336-341 (1987). Beispielsweise können bei
- 30 Detektion der Fluoreszenzlebensdauer die in Sauer et al., J. Fluor. 5, 247-254, 1995 offenbarten Farbstoffe JA22, JA66, JA51-DS sowie der Cyaninfarbstoff Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet werden; bei Detektion der Farbe können die Farbstoffe FAM, JOE, TAMRA und ROX
- 35 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) Anwendung finden. Während im ersten erfindungsgemäßen Verfahren die lumineszenzmarkierten Nukleotide mit unterschiedlichen Luminophoren markiert sind, kann im zweiten erfindungsgemäßen Verfahren für jedes Nukleotid der Farbstoff identisch sein,
- 40 da die Unterscheidung der Nukleotide durch die Verschiedenheit der jeweiligen Lösung ermöglicht wird. Im

- 5    Hinblick auf eine vereinfachte Anregung und Detektion ist diese Vorgehensweise erfindungsgemäß bevorzugt.

Der Einzelmoleküldetektor umfaßt eine Abbildungsoptik, eine Einheit, die bei Auftreffen von Photonen ein elektrisches  
10   Signal erzeugt sowie einen Computer samt Software zur Auswertung der elektrischen Signale. Die Abbildungsoptik ermöglicht vorzugsweise eine zu dem Fokus des Laserstrahles konfokale Abbildung der emittierten Photonen auf die Einheit zur Erzeugung eines elektrischen Signals. Diese Einheit ist  
15   vorzugsweise eine Photodiode, insbesondere bevorzugt eine Einzelphotonenzähl-Avalanche-Photodiode. Alternativ kann auch ein Photomultiplier oder eine verstärkte CCD-Kamera verwendet werden. Insbesondere wird bevorzugt, den erfindungsgemäß verwendbaren Einzelmoleküldetektor derart einzurichten, daß  
20   die Detektion erst nach einer bestimmten Zeit nach der Anregung durch den Laser beginnt ("Gating"). Ein erfindungsgemäß verwendbarer Einzelmoleküldetektor ist beschrieben in Löscher et al., Anal.Chem., Band 70, S.3202-3205, 1998. Für eine Farbumterscheidung ist der  
25   Einzelmoleküldetektor mit entsprechenden Filtern ausgestattet. Für eine Unterscheidung durch Messung der Fluoreszenzlebensdauer wird vorzugsweise ein Detektor verwendet, der im Time-correlated-single photon counting-Modus arbeitet. Weiterhin ist eine schnelle Meßelektronik  
30   erforderlich, wie sie beispielsweise bei SL Microtest GmbH, Jena, erhältlich ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist der Einzelmoleküldetektor eine Autokorrelationsfunktion auf. Die  
35   Autokorrelationsfunktion ermöglicht, die Lumineszenz frei diffundierender Moleküle von der Lumineszenz am immobilisierten Nukleinsäurestrang zu unterscheiden und dient somit einer Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses.

40   Erfindungsgemäß wird das detektierte Lumineszenzsignal des eingebauten Nukleotids vor dem Einbau des jeweils nächsten

5 lumineszenzmarkierten Nukleotids gelöscht. Dies kann durch  
Abspalten der Lumineszenzmarkierung erfolgen, insbesondere  
durch Photoabspaltung. Dies ist möglich, wenn die  
Lumineszenzmarkierung mit dem Nukleotid über eine photolabile  
Gruppe gebunden ist, wie beispielsweise in WO 95/31429  
10 offenbart. Ein kurzer Laserpuls führt dann zur Abspaltung  
der Lumineszenzmarkierung. Zur Abspaltung wird in der Regel  
eine von der Wellenlänge des Lasers zur Anregung verschiedene  
Wellenlänge verwendet. Bevorzugt wird ferner das  
Lumineszenzsignal durch Photobleaching der  
15 Lumineszenzmarkierung des Nukleotides gelöscht. Dies läßt  
sich beispielsweise durch eine kurzfristige Erhöhung der  
Laserintensität, d.h. einen kurzen Laserpuls, erreichen.

Somit hängt die Geschwindigkeit, mit der das  
20 Lumineszenzsignal gelöscht wird, insbesondere von der  
Leistung des Laserpulses wie auch der Dauer des Zeitraumes  
zwischen Detektion und Laserpuls ab. Beide Parameter sind gut  
kontrollierbar. Zur Sicherstellung, daß das Lumineszenzsignal  
des eingebauten Nukleotides vor dem Einbau des jeweils  
25 nächsten Nukleotids gelöscht wird, werden diese Parameter mit  
der Aufbaugeschwindigkeit des Komplementärstranges  
abgestimmt. Die Aufbaugeschwindigkeit des  
Komplementärstranges läßt sich durch Einstellen der  
Temperatur der Lösung, die einen maßgeblichen Einfluß auf die  
30 Polymeraseaktivität hat, und durch Einstellen der  
Nukleotidkonzentrationen kontrollieren.

Wenn nicht alle Nukleotide in dem ersten erfindungsgemäßen  
Verfahren lumineszenzmarkiert sind, läßt sich mit einmaligem  
35 Aufbau des Komplementärstranges die Basensequenz des  
immobilisierten Einzelstranges nicht mit ausreichender  
Genauigkeit in dem ersten erfindungsgemäßen Verfahren  
bestimmen. Folglich muß zur Bestimmung der kompletten Sequenz  
der Aufbau wiederholt werden. Dies wird erfindungsgemäß  
40 bevorzugt an dem gleichen Einzelstrang durchgeführt. Hierzu  
wird der wie oben beschrieben aufgebaute DNS- oder RNS-

5 Komplementärstrang von dem immobilisierten DNS- oder RNS-  
Einzelstrang durch Temperaturerhöhung abgespalten und der  
Verfahrensschritt (3) des oben beschriebenen Verfahrens  
wiederholt. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt somit, die  
Sequenzbestimmung an dem identischen Molekül mehrmals  
10 durchzuführen. Dies ist selbst bei Verwendung nur  
lumineszenzmarkierter Nukleotide vorteilhaft, um die  
Genauigkeit der Sequenzbestimmung zu erhöhen.

Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren an einem  
15 weiteren, auf dem Träger immobilisierten Einzelstrang  
wiederholt werden. Bei Einzelsträngen mit gleicher  
Basensequenz führt dies zu einer höheren Genauigkeit der  
Sequenzbestimmung. Ist die zu sequenzierende Nukleinsäure vor  
der Immobilisierung mit Restriktionsenzymen behandelt worden,  
20 ist so jedoch auch die sukzessive Bestimmung der  
verschiedenen Bruchstücke des Einzelstranges, die durch diese  
Behandlung entstehen, möglich. Die Behandlung mit  
Restriktionsenzymen kann hierbei unmittelbar vor der  
Immobilisierung in dem gleichen Reaktionsgefäß erfolgen.

25

### Beispiele

1. Beispiel: Bei der schrittweisen Bindung des Einzelstranges  
wird für etwa 4 cm<sup>2</sup> Glasoberfläche 1 ml einer 10<sup>-8</sup> mol/l  
30 aminofunktionalisierte Oligonukleotid-Lösung über Nacht in  
PBS-Puffer inkubiert; dann wird durch Zugabe von 1 ml Lösung  
des Einzelstranges in Hybridisierungspuffer (10<sup>-8</sup> mol/l ) 1  
bis 2 h bei Temp.gradient von 58°C zu 28°C hybridisiert; dann  
wird das Farbstoff-markierte Oligonukleotid (10<sup>-8</sup> mol/l , 1  
35 ml Hybridisierungspuffer, Temp.grad 28°C zu 4°C), 2 - 3 h  
gegenhybridisiert. Das ergibt eine Dichte von etwa 1  
Molekülkomplex/10 µm<sup>2</sup>.

2. Beispiel: Bei der zweiten Vorgehensweise, nämlich die  
40 Hybridisierungsschritte vor der Immobilisierung  
durchzuführen, werden der Einzelstrang, das

- 5 aminofunktionalisierte Oligonukleoti, und das Farbstoff-  
markierte Oligonukleotid zusammen in 1 ml Puffer in Konz. Von  
je  $10^{-7}$  mol/l gemischt; schließlich wird diese Lösung auf  $10^{-10}$  mol/l verdünnt und zur Immobilisierung verwendet; ergibt  
ebenfalls eine Dichte von etwa 1 Molekülkomplex/ $10 \mu\text{m}^2$ .
- 10 3. Beispiel: Zu einem immobilisierten Einzelstrang wurden 2  
 $\mu\text{l}$   $10^{-11}$  M Mononukleotide, markiert mit dem Farbstoff Cy5  
(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), und 3,5 u  
P7-Sequenase-Polymerase hinzugefügt. Der Einbau des
- 15 Nukleotides wurde mit einer Laserleistung von  $400 \mu\text{W}$  und  
einem Fokusdurchmesser von  $2 \mu\text{m}$  detektiert.



## 5 Patentansprüche

1. Verfahren zur Basensequenzierung von DNS oder RNS,  
umfassend die Schritte:

- 10 (1) Immobilisieren von DNS- oder RNS-Einzelsträngen auf einer Oberfläche;
- (2) Fokussieren eines Laserstrahles auf einen einzelnen, immobilisierten Einzelstrang;
- 15 (3) Aufbau eines DNS- oder RNS-Komplementärstranges des immobilisierten, fokussierten Einzelstranges durch Zugabe einer Lösung, enthaltend (i) ein Gemisch von Nukleotiden der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zum Aufbau eines DNS-Komplementärstranges oder ein Gemisch von Nukleotiden der Basen Adenin,  
20 Cytosin, Guanin und Uracil zum Aufbau eines RNS-Komplementärstranges und (ii) eine Polymerase,
- 3a) wobei mindestens zwei der vier Nukleotide der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin oder  
25 mindestens zwei der vier Nukleotide der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil ganz oder teilweise unterschiedlich lumineszenzmarkiert sind,
- 3b) jeder Einbau eines lumineszenzmarkierten Nukleotides in den Komplementärstrang mit  
30 einem Einzelmoleküldetektor detektiert wird, und
- 3c) vor dem Einbau des jeweils nächsten lumineszenzmarkierten Nukleotides das  
35 Lumineszenzsignal des vorhergehenden lumineszenzmarkierten Nukleotides gelöscht wird.

2. Verfahren zur Basensequenzierung von DNS oder RNS,  
40 umfassend die Schritte:

- 5           (1) Immobilisieren von DNS- oder RNS-Einzelsträngen auf einer Oberfläche;
- (2) Fokussieren eines Laserstrahles auf einen einzelnen, immobilisierten Einzelstrang;
- 10           (3') Aufbau eines DNS- oder RNS-Komplementärstranges des immobilisierten, fokussierten Einzelstranges durch aufeinanderfolgende Zugabe von Lösungen, enthaltend jeweils (i) ein Nukleotid der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zum Aufbau eines DNS-
- 15           Komplementärstranges oder ein Nukleotid der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil zum Aufbau eines RNS- Komplementärstranges und (ii) eine Polymerase, wobei
- 3a') das in der Lösung enthaltende Nukleotid lumineszenzmarkiert ist,
- 20           3b) jeder Einbau eines lumineszenzmarkierten Nukleotides in den Komplementärstrang mit einem Einzelmoleküldetektor detektiert wird,
- 3c) nach Detektion eines Einbaus eines lumineszenzmarkierten Nukleotides in den
- 25           Komplementärstrang das Lumineszenzsignal des eingebauten Nukleotides gelöscht wird, und
- 3d') vor der Zugabe der jeweils nächsten Lösung gespült wird.
- 30
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei zur Immobilisierung der DNS- oder RNS-Einzelstränge auf einer Oberfläche in Schritt (1) die Einzelstränge über auf der Oberfläche immobilisierte Nukleotid-Oligomere durch
- 35 Hybridisierung immobilisiert werden.
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei der Immobilisierung der DNS- oder RNS-Einzelstränge auf einer Oberfläche in Schritt (1) DNS- oder RNS-
- 40 Einzelstränge in einer Oberflächendichte von  $\leq 1$  Molekül/ $\mu\text{m}^2$  immobilisiert werden.

5

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die Oberflächendichte der Einzelstränge durch Regulierung der Oberflächendichte kovalenter Bindungspunkte auf der Oberfläche eingestellt wird.

10

6. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die Oberflächendichte der Einzelstränge durch die Konzentration der zu immobilisierenden Einzelstränge oder der zu immobilisierenden Oligomere eingestellt wird.

15

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum Fokussieren des Laserstrahls auf den immobilisierten Einzelstrang in Schritt (2)

20

a) ein lumineszenzmarkiertes Nukleotid-Oligomer mit dem Einzelstrang hybridisiert wird,

b) die Position des hybridisierten Nukleotid - Oligomers durch Abscannen der Oberfläche mit einem Laserstrahl bestimmt wird, und

25

c) das Lumineszenzsignal des hybridisierten Nukleotid-Oligomers anschließend gelöscht wird.

30

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jeder Einbau eines lumineszenzmarkierten Nukleotides in den Komplementärstrang in Schritt (3b) über die Fluoreszenzlebensdauer des lumineszenzmarkierten Nukleotides detektiert wird.

35

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei jeder Einbau eines lumineszenzmarkierten Nukleotides in den Komplementärstrang in Schritt (3b) durch die Farbe des lumineszenzmarkierten Nukleotides detektiert wird.

40

10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Einzelmoleküldetektor in Schritt (3b) eine Autokorrelationsfunktion aufweist.

5

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Löschen des Lumineszenzsignals in Schritt (3c) durch Abspalten der Lumineszenzmarkierung des Nukleotides erfolgt.

10

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Löschen des Lumineszenzsignals in Schritt (3c) durch Photobleaching der Lumineszenzmarkierung des Nukleotides erfolgt.

15

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Löschen des Lumineszenzsignals vor dem Einbau der jeweils nächsten Base in Schritt (3c) durch Abstimmung der Parameter Polymeraseaktivität, Laserintensität und Nukleotidkonzentration erfolgt.

20

14. Verfahren zur Basensequenzierung von DNS oder RNS, wobei der gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche aufgebaute DNS- oder RNS-Komplementärstrang von dem immobilisierten DNS- oder RNS-Einzelstrang durch Temperaturerhöhung abgespalten wird und das Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche an dem gleichen Einzelstrang wiederholt wird.

25

15. Verfahren zur Basensequenzierung von DNS oder RNS, wobei das Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche an einem weiteren, auf der Oberfläche immobilisierten DNS- oder RNS-Einzelstrang wiederholt wird.

30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

**PCT/EP 99/07209**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C1201/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 547 839 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 20 August 1996 (1996-08-20) the whole document	1-15
Y	WO 98 33939 A (HITACHI LTD ;ANAZAWA TAKASHI (JP); KAMBARA HIDEKI (JP); OKANO KAZU) 6 August 1998 (1998-08-06) the whole document	1-15
A	US 5 302 509 A (CHEESEMAN PETER C) 12 April 1994 (1994-04-12) the whole document	1-15
A	EP 0 731 173 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 11 September 1996 (1996-09-11) the whole document	1-15
	— —/—	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

**Y** Patent family members are listed in annex.

- **Special categories of cited documents :**

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

7. document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

**\*T** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

**"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone**

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

**"A" document member of the same patent family**

Date of the actual completion of the international search

**15 February 2000**

Date of mailing of the international search report

**28/02/2000**

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

**Authorized officer**

Reuter, U

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/07209

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 13666 A (AMERSHAM INT PLC) 15 November 1990 (1990-11-15) the whole document	1-15
A	US 5 674 743 A (ULMER KEVIN M) 7 October 1997 (1997-10-07) the whole document	1-15
A	SEGER, STEFAN: "Single molecule fluorescence. High performance molecular diagnosis and screening" BIOFORUM , 21(4), 179-180,182-185 , April 1998 (1998-04), XP000878834 the whole document	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter: 1st Application No

PCT/EP 99/07209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5547839 A	20-08-1996	US 5143854 A	01-09-1992
		AU 9136791 A	08-07-1992
		WO 9210587 A	25-06-1992
		US 5902723 A	11-05-1999
		AT 110738 T	15-09-1994
		AT 175421 T	15-01-1999
		AU 651795 B	04-08-1994
		AU 5837190 A	07-01-1991
		AU 672723 B	10-10-1996
		AU 7765594 A	04-05-1995
		CA 2054706 A	08-12-1990
		DE 69012119 D	06-10-1994
		DE 69012119 T	22-12-1994
		DE 69032888 D	18-02-1999
		DE 69032888 T	29-07-1999
		DK 476014 T	14-11-1994
		EP 0476014 A	25-03-1992
		EP 0619321 A	12-10-1994
		EP 0902034 A	17-03-1999
		EP 0953835 A	03-11-1999
		ES 2058921 T	01-11-1994
		ES 2129101 T	01-06-1999
		GB 2248840 A, B	22-04-1992
		HK 61395 A	05-05-1995
		HK 64195 A	05-05-1995
		HU 59938 A	28-07-1992
		IL 94551 A	30-03-1995
		JP 11315095 A	16-11-1999
		JP 11021293 A	26-01-1999
		JP 4505763 T	08-10-1992
		KR 9701577 B	11-02-1997
		KR 9701578 B	11-02-1997
		WO 9015070 A	13-12-1990
		NL 191992 B	01-08-1996
		NL 9022056 T	02-03-1992
		NO 301233 B	29-09-1997
		NZ 233886 A	25-02-1993
		SG 13595 G	16-06-1995
		US 5744101 A	28-04-1998
		US 5489678 A	06-02-1996
		US 5889165 A	30-03-1999
		US 5753788 A	19-05-1998
		US 5744305 A	28-04-1998
		US 5770456 A	23-06-1998
		US 5800992 A	01-09-1998
		US 5424186 A	13-06-1995
		US 5405783 A	11-04-1995
		US 5871928 A	16-02-1999
		US 5510270 A	23-04-1996
WO 9833939 A	06-08-1998	NONE	
US 5302509 A	12-04-1994	NONE	
EP 0731173 A	11-09-1996	DE 19508366 A	12-09-1996
		JP 8242858 A	24-09-1996
		US 5807677 A	15-09-1998

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter national Application No

PCT/EP 99/07209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9013666 A	15-11-1990	CA 2045505 A EP 0471732 A JP 4505251 T	12-11-1990 26-02-1992 17-09-1992
US 5674743 A	07-10-1997	AU 1228197 A AU 673245 B AU 6131694 A CA 2155186 A EP 0682671 A JP 8506664 T MX 9400837 A WO 9418218 A	27-03-1997 31-10-1996 29-08-1994 18-08-1994 22-11-1995 16-07-1996 31-08-1994 18-08-1994



**PCT/EP 99/07209**

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abkommen

PCT/EP 99/07209

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 90 13666 A (AMERSHAM INT PLC) 15. November 1990 (1990-11-15) das ganze Dokument	1-15
A	US 5 674 743 A (ULMER KEVIN M) 7. Oktober 1997 (1997-10-07) das ganze Dokument	1-15
A	SEEGER, STEFAN: "Single molecule fluorescence. High performance molecular diagnosis and screening" BIOFORUM , 21(4), 179-180, 182-185 , April 1998 (1998-04), XP000878834 das ganze Dokument	1-15

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/07209

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5547839 A	20-08-1996	US 5143854 A	01-09-1992
		AU 9136791 A	08-07-1992
		WO 9210587 A	25-06-1992
		US 5902723 A	11-05-1999
		AT 110738 T	15-09-1994
		AT 175421 T	15-01-1999
		AU 651795 B	04-08-1994
		AU 5837190 A	07-01-1991
		AU 672723 B	10-10-1996
		AU 7765594 A	04-05-1995
		CA 2054706 A	08-12-1990
		DE 69012119 D	06-10-1994
		DE 69012119 T	22-12-1994
		DE 69032888 D	18-02-1999
		DE 69032888 T	29-07-1999
		DK 476014 T	14-11-1994
		EP 0476014 A	25-03-1992
		EP 0619321 A	12-10-1994
		EP 0902034 A	17-03-1999
		EP 0953835 A	03-11-1999
		ES 2058921 T	01-11-1994
		ES 2129101 T	01-06-1999
		GB 2248840 A,B	22-04-1992
		HK 61395 A	05-05-1995
		HK 64195 A	05-05-1995
		HU 59938 A	28-07-1992
		IL 94551 A	30-03-1995
		JP 11315095 A	16-11-1999
		JP 11021293 A	26-01-1999
		JP 4505763 T	08-10-1992
		KR 9701577 B	11-02-1997
		KR 9701578 B	11-02-1997
		WO 9015070 A	13-12-1990
		NL 191992 B	01-08-1996
		NL 9022056 T	02-03-1992
		NO 301233 B	29-09-1997
		NZ 233886 A	25-02-1993
		SG 13595 G	16-06-1995
		US 5744101 A	28-04-1998
		US 5489678 A	06-02-1996
		US 5889165 A	30-03-1999
		US 5753788 A	19-05-1998
		US 5744305 A	28-04-1998
		US 5770456 A	23-06-1998
		US 5800992 A	01-09-1998
		US 5424186 A	13-06-1995
		US 5405783 A	11-04-1995
		US 5871928 A	16-02-1999
		US 5510270 A	23-04-1996
WO 9833939 A	06-08-1998	KEINE	
US 5302509 A	12-04-1994	KEINE	
EP 0731173 A	11-09-1996	DE 19508366 A	12-09-1996
		JP 8242858 A	24-09-1996
		US 5807677 A	15-09-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter-ales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07209

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9013666 A	15-11-1990	CA 2045505 A	12-11-1990
		EP 0471732 A	26-02-1992
		JP 4505251 T	17-09-1992
US 5674743 A	07-10-1997	AU 1228197 A	27-03-1997
		AU 673245 B	31-10-1996
		AU 6131694 A	29-08-1994
		CA 2155186 A	18-08-1994
		EP 0682671 A	22-11-1995
		JP 8506664 T	16-07-1996
		MX 9400837 A	31-08-1994
		WO 9418218 A	18-08-1994